UNIVERSITÉ DE STRASBOURG — FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1934 - 1935 — N° 139

DE L'INFLUENCE DE CERTAINS MILIEUX DE CULTURE SUR L'ACIDO-RÉSISTANCE DU BACILLE TUBERCULEUX

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le ..... Juillet 1935
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le grade de Docteur de l'Université
(Mention Pharmacie)

PAR

Mademoiselle Thérèse RENARD
Pharmacien

Examinateurs de la Thèse — Juges

MM. A. SARTORY, Professeur, Président
Y. VOLMAR, Professeur
R. SARTORY, Chargé des fonctions d'agrégé

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG — FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1934 - 1935 — N° 139

DE L'INFLUENCE DE CERTAINS MILIEUX DE CULTURE SUR L'ACIDO-RÉSISTANCE DU BACILLE TUBERCULEUX

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le ..... Juillet 1935
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le grade de Docteur de l'Université
(Mention Pharmacie)

PAR

Mademoiselle Thérèse RENARD
Pharmacien

Examinateurs de la Thèse — Juges

MM. A. SARTORY, Professeur, Président
Y. VOLMAR, Professeur
R. SARTORY, Chargé des fonctions d'agrégé

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. LOBSTEIN, *Doyen*, ✲, ⚜, I. ⓘ, ⚜.
A. SARTORY, *Assesseur*, C. ✲, I. ⓘ, C. ⚜.
CUVIER, *Secrétaire*, ⓘ.

DOYEN HONORAIRE

M. JADIN, O. ✲, I. ⓘ, ⚜.

PROFESSEURS

MM.	A. SARTORY, C. ✲, I. ⓘ, C. ⚜	Bactériologie.
	LAVIALLE, I. ⓘ, ⚜	Botanique.
	VOLMAR, I. ⓘ	Chimie organique.
	LOBSTEIN, ✲, ⚜, I. ⓘ, ⚜	Matière médicale.
	GUILLAUME, ✲, ⚜, I. ⓘ, ⚜	Pharmacie galénique.
	LAPP, ⓘ	Pharmacie chimique.
	N. (CORDIER, chargé de cours)	Chimie analytique.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. BRÆMER, ✲, I. ⓘ, O. ⚜
JADIN, O. ✲, I. ⓘ, ⚜.

CHARGÉ DES FONCTIONS D'AGRÉGÉ

M. R. SARTORY, ⚜.

COURS COMPLÉMENTAIRES

MM.	A. SARTORY	Hygiène.
	LAVIALLE	Hydrologie.
	VOLMAR	Chimie minérale.
	LOBSTEIN	Toxicologie.
	GUILLAUME	Zoologie.
	LAPP	Physique.
	EISENMANN	Législation et Déontologie.
	CORDIER	Chimie biologique.
	R. SARTORY	Cryptogamie.

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM.	R. SARTORY, ⚜	Bactériologie et Parasitologie.
	COLLARD, I. ⓘ, ⚜	Chimie pharmaceutique.
	N.	Chimie et Physique.
	BOHN, ⓘ	Histoire naturelle.

De l'Influence de certains Milieux de Culture sur l'Acido-Résistance du Bacille Tuberculeux

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR A. SARTORY

Directeur du Laboratoire de Bactériologie
de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Hommage de respectueuse reconnaissance.

A MES JUGES

MONSIEUR VOLMAR

Directeur du Laboratoire de Chimie
de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

MONSIEUR R. SARTORY

Chargé des fonctions d'Agrégé
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Hommage de profonde gratitude.

A mes Parents

A mes Amis

INTRODUCTION

C'est depuis des temps très reculés, que l'on connaît le virus tuberculeux.

Les Védas de l'Inde, le Zend-Avesta, livre sacré des Parsis, les écrits d'Hippocrate, ceux de Celse, d'Aretee, de Cappadoce (70 ans *avant J.-C.), et d'Avicenne, abondent déjà en documents relatifs à la Tuberculose.*

ELLIOTT, SMITH et Armand RUFFER, FOUQUET, WOOD, JONES et DERRY (23) *étudiant les momies d'Egypte, ont constaté les ravages que cette maladie exerçait sur les sujets des Pharaons.*

*A la fin du XVIII*e *siècle, les travaux des médecins anglais Th. REID* (64) *en* 1785, *puis BAILLIE* (6) *en* 1793, *attirent l'attention sur les granulations et les tubercules des poumons.*

En 1810, *G. L. BAYLE* (8) *identifie la tuberculose avec la scrofule.*

Enfin LAENNEC (1781-1826) *élargit définitivement les connaissances sur la tuberculose:*

« *La matière tuberculeuse peut se développer dans les poumons et dans les autres organes sous deux formes principales: Celle de corps isolés, granulation, tubercule miliaire, tubercule crû, tubercule caséeux, ulcéreux ou caverne, et d'infiltration* ».

« *Il n'est peut-être aucun organe, disait LAENNEC, qui soit exempt du développement des tubercules* ».

Un peu plus tard, VILLEMIN (84), *dans une note à l'Académie de Médecine le 5 décembre* 1765, *reconnaît que* « *la Tuberculose est une affection spécifique. Sa cause réside dans un agent inoculable. Elle appartient donc à la classe des maladies virulentes et devra prendre place, dans le cadre nosologique, à côté de la syphilis, mais plus près de la morve-farcin* ».

Mais c'est à Robert KOCH (44) *en* 1882, *que revient le mérite de la découverte du bacille auquel son nom reste attaché.*

Mais n'oublions pas que KOCH avait posé en principe la fixité et l'inaltérabilité des espèces bactériennes. Pourtant la théorie de « *la variation naturelle* »

des espèces biologiques, admise depuis le dix-neuvième siècle, nous montre qu'un organisme quelconque ne présente jamais un état de stabilité constant, mais qu'il est soumis à des changements dûs, soit à des transformations internes, soit à l'influence des milieux où il vit.

Or, les progrès actuels de la Bactériologie ne mettent plus en doute le polymorphisme des bactéries.

PASTEUR en 1881, étudie déjà les formes atténuées du BACILLUS ANTHRACIS, par sa culture à des températures anormales.

LEHMANN et NEUMANN (48) en 1896 étudient pour la première fois les relations entre les formes des cultures microbiennes et leurs propriétés biologiques.

Ces observations sont reprises par NEISSER en 1906 et MASSINI (54) en 1907, sur le BACILLUS COLI « mutabile » et continuées par BAERTHLEIN (4) de 1912 à 1918.

Des expériences sont tentées également et confirmées par MARY COWAN (15) de 1922 à 1924 sur les streptocoques, par GRIFFITH (55) en 1923 et REIMANN (65) en 1925 sur les pneumocoques, par TOPLEY AYRTON (79) en 1924 sur les BACILLUS ENTHERIDITIS, par BRUCE WHITE (86) en 1925 pour le groupe SALMONELLA, par JULIANELLE (42) en 1926 pour le bacille de FRIEDLANDER, par HARDLEY (39) en 1927, en ce qui concerne le bacille PYOCYANEUS, par SOULE (75) de 1928 à 1932 pour le bacillus SUBTILIS et autres espèces microbiennes.

En ce qui concerne les variations du MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS, elles furent étudiées pour la première fois par GASPERINI (31), en 1895, par comparaison avec l'ACTINOMYCES ALBA, par NOCARD (59) en 1898, par BANG (7) en 1908 qui observe le changement des bacilles tuberculeux Bovins en bacilles Aviaires, et par FERRAN (26) qui, déjà en 1905, puis plus tard, en 1923, prétend que par mutation brusque, le Bacille de KOCH peut donner naissance à deux nouvelles espèces, l'une acido résistante et l'autre, non acido résistante.

La dissociation spontanée du bacille de KOCH en colonies différentes, fut aussi étudiée par BAERTHLEIN et TOJODA (5) en 1913, puis par GILDEMEISTER (33) en 1921.

Citons encore les études de KOLLE, SCHLOSSBERGER et PFANNENSTIEL (45) en 1921, de KAHN (43) en 1929.

Les travaux actuels de PETROFF et de ses collaborateurs, BRANGH, STEENKEN et WINN (62) de 1927 à 1933, ceux de KRAUS (47) en 1929, ELBERT et GELBERG (22) en 1930, NECHTADIMENKO, ODRINA,

SYSSAK et ANGUENITSKI (56), *TZEKNOWITZER en* 1930, *BEGBIE* (9), *DOAN* (18) *en* 1931, *KAHN et SCHWAZKOPF* (72), *REED et RICE* (63) *de* 1931 *à* 1933, *MAZUR* (55), *CHRISTISON* (14) *en* 1932, *SEIBERT, LONG et MORLEY* (50), *ZULMANN* (88), *NEGRE, VALTIS et BONNEFOI* (57) *en* 1933, *VALTIS et VAN DEINSE* (81) *de* 1933 *à* 1934, *SAENZ et COSTIL* (68), *Armand DELILLE et GAVOIS* (16), *SCHNIEDER* (71) *en* 1933 *et BIRKHAUG* (12) *de* 1932 *à* 1934, *s'ils sont parfois contradictoires, ne mettent plus en doute, à l'heure actuelle, l'existence de formes polymorphiques du Bacille de KOCH.*

Citons enfin les études très intéressantes de KONRAD et BIRKHAUG en janvier 1935 (12) *sur la dissociation du bacille de KOCH en variétés bien caractérisées, R et S et CH ; ainsi que les travaux de A. Ch. HOLLANDE et de Mme G. HOLLANDE* (40) *en* 1931, *et nous nous rendrons compte que la question des changements que le Bacille de KOCH peut apporter au cours de son développement sur différents milieux, est assez étudiée à l'heure actuelle.*

Sur le conseil de notre Maître, M. le Professeur A. SARTORY, nous nous sommes intéressés à une partie assez limitée de cette question et nous nous sommes proposé d'étudier l'influence de certains milieux sur l'acido résistance du bacille de KOCH.

Notre travail se divise en trois parties :

Dans la première, nous avons fait l'Historique de la question.

La deuxième partie est consacrée à nos recherches personnelles. Elle comprend la culture et l'étude du Bacille sur différents milieux.

Dans la troisième partie, nous exposons les résultats obtenus et les conclusions que l'on peut en tirer.

Avant d'entrer dans le détail de nos recherches, qu'il nous soit permis d'adresser à notre Maître, M. le Professeur A. SARTORY, l'expression de notre sincère et respectueuse reconnaissance.

Sa connaissance de la question et l'intérêt qu'il nous a montré, ont beaucoup facilité notre tâche.

Nous remercions également M. le Professeur VOLMAR et M. R. SARTORY d'avoir bien voulu faire partie du jury de cette thèse.

Mme SAUTER et M. MEYER assistants, nous ont souvent apporté une aide précieuse et amicale.

Qu'ils trouvent, ici, l'expression de notre gratitude bien sincère.

HISTORIQUE

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le Bacille de la tuberculose a fait l'objet de nombreuses études.

Celles-ci ont porté surtout sur son mode de culture, sa composition, ses formes culturales, sa virulence et l'atténuation de celle-ci.

Mais c'est seulement depuis une trentaine d'années, que l'on s'attache à étudier sérieusement son acido-résistance.

Pour ne pas être trop long, nous ne mentionnerons ici que les travaux les plus importants effectués dans le but de diminuer cette acido-résistance, qui semble bien avoir une influence importante sur la virulence du microbe.

Disons tout de suite que le bacille de KOCH présente, comparativement aux autres microbes, deux propriétés essentielles qui le rendent assez facilement reconnaissable, ce sont :

1° la faculté de se laisser difficilement pénétrer par les couleurs basiques d'aniline.

2° la faculté de retenir fortement la matière colorante et de résister à la décoloration par les acides et l'alcool.

De là son titre de bacille acido-résistant par excellence.

KOCH n'avait pas bien mis en valeur cette propriété. C'est à EHRLICH (21) en 1882 (21) qu'en revient la découverte.

Par la suite, de nombreuses études ont été faites sur la cause de cette acido-résistance.

Le premier, EHRLICH l'attribue à l'imperméabilité de la membrane des bacilles. Mais ZIEHL, en démontrant que l'acide azotique pénètre dans le protoplasme cellulaire, détruit cette hypothèse.

BIENSTOCK (11), SPINA (76), KLEBS (44) et KOCH en 1887, en font une propriété des matières grasses contenues dans le bacille en très grande abondance. Mais en 1896, RUPPEL (67), constate que l'acido-résistance persiste chez les bacilles privés totalement de leurs matières grasses.

Pour HAMMERSCHLAG (37) on aurait affaire à une substance albumino-cellulosique.

Pour HELBING (38) et RUPPEL (67), ce serait une matière albuminoïde voisine de la chitine.

Pour AUCLAIR et PARIS (3), elle serait propre au squelette cellulosique et au protoplasme du microbe.

En 1902 GRIMME (36), sans préciser la nature chimique de la substance acido-résistante, pense qu'elle est soluble dans l'alcool à 80°, l'éther et le xylol ; il démontre que l'eau de Javel la détruit et qu'elle se combine avec la fuchsine de ZIEHL pour former un composé inattaquable par les acides. Elle se distinguerait des graisses par sa solubilité dans l'acide chlorhydrique à 5 ‰, et des matières albuminoïdes par sa solubilité dans l'alcool, l'éther, le xylol et sa résistance aux agents de putréfaction.

En 1904, W. BULLOCH et J. R. MACLEOD (13), opérant sur plusieurs kilogrammes de bacilles desséchés, ont extrait les graisses par l'alcool méthylique bouillant, et, par refroidissement, ont obtenu un précipité blanchâtre ; c'est la matière acido-résistante que l'on pourrait saponifier et décomposer en acides gras et en une poudre blanche qui serait un alcool. Ils ont pu obtenir un gramme de cette poudre à l'état pur. En définitive, c'est à cet alcool qu'ils attribuent l'acido-résistance du bacille de KOCH.

En 1912, SALIMBENI utilise la monochlorhydrine. Sous l'action de ce dissolvant, les bacilles présentent des modifications plus ou moins rapides et profondes, suivant la quantité des éthers employés et le nombre de leurs radicaux acides.

C'est ainsi que, pour un mélange à parties égales de microbes et de mono ou dichlorhydrine, la masse microbienne, triturée dans un mortier, se transforme en quelques secondes en une pâte homogène, plus ou moins collante. Additionnée de quelques gouttes de réactif, elle devient liquide. Par action de la trichlorhydrine, on obtient une émulsion très fine et plus transparente que la solution précédente. Les bacilles perdent en quelques minutes leur acido-résistance, deviennent granuleux et se transforment en une masse amorphe qui n'est plus colorable.

En 1913, SAKAE TAMURA (78) établit que l'acido-résistance est liée à la présence d'un alcool qu'il désigne sous le nom de « Mykol ». Cet alcool aurait pour formule C^{29} H^{56} O ; il serait soluble dans le chloroforme, le xylol, le toluène, l'éther de pétrole et l'éther, mais peu soluble dans l'alcool froid et l'alcool méthylique.

GORIS (34) en 1920 conclut que l'acido-résistance du bacille de KOCH est due principalement à certains lipoïdes qui l'imprègnent. Parmi les subs-

tances actives on aurait affaire aux acides gras libres, mais surtout aux cires, et à l'alcool libre ou qui provient de la saponification de cette cire (mykol).

Il existe aussi des théories physicochimiques de l'acido-résistance du bacille tuberculeux.

En 1899, FISCHER (27) et PAPPENHEIM (61) admettent que la colorabilité du bacille de KOCH est en rapport avec la capacité d'absorption du protoplasme cellulaire.

En 1922, E. LONG (50) pense que l'acido-résistance est due, non pas à la combinaison chimique du mykol avec les albumines, mais au mode de répartition de ces substances dans la cellule microbienne, puisqu'une simple opération physique comme un broyage mécanique suffit à faire perdre au bacille sa résistance à la décoloration.

Nous voyons donc que les causes de l'acido-résistance du bacille de KOCH, bien qu'elles aient été passablement étudiées, ne sont pas encore nettement définies à l'heure actuelle, ce qui ne nous donne que peu de renseignements sur la manière d'atténuer cette propriété.

Malgré tout, de nombreux auteurs ont essayé de la diminuer, soit comme LOBSTEIN (49) en 1922, en faisant varier les temps de coloration, soit en modifiant les milieux de culture employés. Sur ce point surtout, les travaux modernes sont assez abondants.

En 1897, FERRAN, (26) par modification des milieux de culture, (suppression de la glycérine) obtient des bacilles qui ne sont pas acido-résistants.

Ces faits furent vérifiés par DUBARD, ARLOING et COURMONT (1) en 1918, ainsi que par AUCLAIR (2) SANTINI en 1914(69), OYUELA en 1919 (60).

En outre, des phénomènes analogues furent constatés par STEPHEN MAER (52) de New-York dès 1910, ALEXANDRE GARCIA de Philadelphie, LEO KARWAKY de Varsovie, KONSTANTIN KLEPTZOV (46) de Kazan et DIXON (17) en 1913.

Plus récemment en 1926, il faut noter les observations de BEZANÇON et PHILIBERT (10) qui obtiennent en cultures des filaments non acido-résistants.

D'autre part, KAHN (43) en 1930, observe dans ses cultures des granules tuberculeux donnant naissance à des filaments non acido-résistants.

En 1921, VAUDREMER (82), cultivant le bacille sur gélose ordinaire et sur bouillon de pommes de terre sans glycérine, obtient un bacille non acido-résistant se colorant au violet de gentiane et ne produisant pas de tuberculine.

En 1928, FREI et N. POCKSCHISCHEWSKY (29) remarquent qu'en cultivant certains bacilles acido-résistants sur des milieux acides, on leur enlève leur acido-résistance, qu'ils reprennent d'ailleurs après cultures sur milieux alcalins.

En même temps, SUNEYAGA (77) constate qu'en milieux pauvres en substances nutritives, les bacilles sont moins acido-résistants.

De même R. VOLLUM (85) en 1932, prétend que les cultures non acido-résistantes, s'observent dans les milieux très nutritifs ou très pauvres, qui, d'après lui, ne contiennent pas les hydrates de carbone nécessaires à la fabrication de la substance acido-résistante.

De nombreux auteurs ont en outre étudié l'influence directe de certains produits chimiques sur l'acido-résistance du bacille.

C'est ainsi que J. ERSKOV (25) en 1926 constate que sur un milieu contenant de l'eau peptonée à 0,5 % et du bouillon glucosé à 1 %, il obtient des éléments non acido-résistants.

La même année, M. ISABOLINSKY (41) et W. GHITOVITCH (41) cultivant le bacille sur des milieux contenant des lipoïdes, constatent qu'après 5 jours de contact, l'acido-résistance disparaît graduellement.

En faisant agir le tribromoxyphénol sur des cultures de bacilles de KOCH, souche Bovine Vallée, Mlle T. DUBOSC et M. ROUX (20), dès 1922 observent qu'au bout de 3 semaines, la coloration au Ziehl montre une disparition progressive de l'acido-résistance du bacille, l'action étant toutefois moins rapide sur le bacille aviaire que sur le bacille humain.

Un an plus tard, Fernand WYSS (87) étudie l'action de la saponine. Il ensemence le bacille sur milieux de pommes de terre, de TERROINE-LOBSTEIN, auxquels il ajoute 4 gouttes d'une solution de saponine dépurée Siegfried à 0, 25 %. Dans ce cas, au bout de 20 jours de culture, il observe au microscope, des cellules microbiennes fragmentées, granuleuses, et une bifurcation très nette des bâtonnets dont l'acido-résistance est fortement diminuée.

En 1927, on a également étudié l'action du Terpophène (émulsion de Terpinoléine à 60 %) sur le bacille de KOCH. Les bacilles tuberculeux en contact avec cette substance, pendant 100 jours consécutifs, semblent perdre leur acido-résistance, l'action étant d'autant plus nette, que la quantité de terpophène employée est plus grande.

Enfin tout dernièrement, Février 1935, des études sont en cours sur l'influence du silicium sur les cultures de bacilles de KOCH. Ces études sont faites par ROYO WILLANOVA et J. PARDO CANALIS de Saragosse (83).

Citons en outre que, à part les produits chimiques, quelques auteurs ont étudié l'action des champignons ou de certains bacilles sur le bacille de KOCH.

Citons pour exemple A. MACHADO (51) qui, en 1926, découvre une Mucédinée de souche amylolytique qui a la propriété de priver le bacille tuberculeux de son acido-résistance. Il cultive celui-ci sur du bouillon âgé d'un mois, fait tomber le voile au fond du ballon, transvase le bouillon surnageant et le remplace aseptiquement par une solution glucosée à 5 ‰, stérilisée sur laquelle il ensemence la Mucédinée. Après deux à trois mois de séjour à l'étuve entre 25 et 37°, il retire les bacilles qu'il broie de façon à avoir une émulsion convenable. Il traite par la méthode de ZIEHL et constate que les bacilles ne sont plus colorés que par le bleu de méthylène. D'après MACHADO, ce fait serait dû aux diastases produites par la Mucédinée.

Et MM. GESSARD, FERNBACH, ROLLIER en 1925 (32) qui prétendent que le bacille Pyocyanique diminue l'acido-résistance du bacille de KOCH.

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE I

Cultures sur Milieux Acides

Avant d'entrer dans les détails de nos cultures, donnons rapidement quelques indications sur la composition et morphologie du bacille de KOCH, telle que l'on peut l'envisager à l'heure actuelle, d'après les travaux modernes.

GORIS, en 1920, donne un tableau assez complet et qui nous a paru intéressant de la composition chimique du bacille : Comme substances non-lipoïdes, il constate :

1° L'existence d'une substance soluble dans l'eau et précipitée par l'alcool, qui est une nucléoalbumine donnant les réactions de la tuberculine ;

2° L'existence d'amino acides provenant de la digestion des matières albuminoïdes par le bacille.

Comme substances lipidiques, il trouve :

1° Une sorte d'éther qu'il appelle le Hyalinol, qui est soluble dans le chloroforme, insoluble dans l'éther ordinaire, et qui peut se dédoubler en acide crotonique, et acide iso-crotonique, et une essence.

2° Une matière grasse constituée par des glycérides de l'acide oléique, palmitique, stéarique, arachidique, avec un peu d'acide caproïque, et d'acide butyrique ;

3° Une substance fondant à 300°, indéterminable ;

4° Une cire dont la saponification donne de l'acide laurique et du mykol ;

5° Un mélange cireux résinoïde, contenant différents composés en particulier un phosphatide, et dont la saponification donne :

2 alcools à poids moléculaire élevé dont le mykol fondant à 65°, et un autre alcool ;
et un mélange d'acide palmitique et stéarique.

Cette cire serait donc constituée par des éthers de ces acides et des 2 alcools précédents.

N'oublions pas que c'est en grande partie à cette cire que GORIS et la plupart des auteurs attribuent l'acido-résistance du bacille de KOCH. Il est de fait que les cires et les matières grasses possèdent réellement cette propriété.

D'après les expériences de LOBSTEIN (49) en 1921, si l'on soumet un papier filtre imprégné d'une solution chloroformique de cholestérine à la coloration au ZIEHL, on constate une acido-résistance très nette. Il en est ainsi si l'on traite de la même manière les graisses extraites du bacille tuberculeux dans l'appareil de SOXHLET, par l'alcool, l'éther ou le chloroforme.

D'autre part, BEHRING, CAMUS et PAGNIEZ, BEZANÇON et PHILIBERT, AUCLAIR et PARIS, prétendent que dégraissés les bacilles sont encore acido-résistants.

Pourtant BEZANÇON et PHILIBERT arrivent à rendre acido-résistants, certains bacilles en les cultivant sur des milieux gras, à base de lanoline ou de beurre.

D'autre part, suivant la théorie généralement admise, il semblerait que, en cultivant le bacille de KOCH sur des milieux acides, celui-ci perd peu à peu son acido-résistance.

Nous basant sur cette théorie, nous avons essayé l'influence de certains milieux acides sur le bacille de KOCH.

Au cours de nos multiples expériences, nous avons utilisé comme milieu témoin, le milieu de J. MEYER, employé couramment dans le laboratoire de Bactériologie et de Cryptogamie de la Faculté de Strasbourg. Ce milieu est très facile à préparer et donne des cultures luxuriantes. Voici son mode de préparation.

On pèle des pommes de terre et on les découpe en fragments minces. On fait cuire une partie des fragments de pommes de terre dans deux parties d'eau ; puis on laisse macérer 3 à 4 heures et on filtre sur toile ; on ajoute au filtrat, à parties égales, son volume de bouillon glycériné à 6 % + 2 % de glucose.

Le pH de ce milieu est fixé à 6,8 et 7,2 pour les bacilles de la tuberculose du type bovin (souche Vallée) et le bacille CALMETTE GUERIN. On

répartit en ballons, on bouche avec du coton et on stérilise à 120° pendant 30 minutes à l'autoclave.

A ce milieu, nous avons ajouté différents acides tels que :

L'acide sulfurique normal

L'acide chlorhydrique normal

et L'acide Sulfogaïacolique

de façon à constituer les milieux suivants :

Milieu contenant 5 ‰ de SO^4H^2N.

Milieu contenant 5 ‰ de HCL *N*

Milieu contenant 5 ‰ d'Acide Sulfogaïacolique

puis une autre série des mêmes bouillons à 10 % de chaque acide.

Milieu contenant 10 ‰ de SO^4H^2N

Milieu contenant 10 ‰ de HCL *N*

Milieu contenant 10 ‰ d'Acide Sulfogaïcolique.

Ces milieux furent ajustés à un pH de 6,8 à 7,2.

Ajoutons que les acides et les milieux témoins furent toujours stérilisés séparément et mélangés à froid, de façon à éviter toute action réductrice ou hydrolisante, en particulier, la formation d'acroleine à partir de la glycérine du milieu.

Pour nos expériences, nous avons toujours eu recours à 2 mêmes souches de bacilles tuberculeux ; la souche bovine Vallée et la souche CALMETTE GUERIN.

Ces deux bacilles furent cultivés parallèlement sur les milieux indiqués plus haut et toujours comparativement au milieu témoin.

Les Bacilles ensemencés ainsi sur les milieux d'épreuve, montrent un léger retard sur ceux des tubes témoins. Pourtant, au bout de 3 à 4 semaines, nous commençons à obtenir des colonies assez abondantes, de couleur crémeuse groupées en amas granuleux entourés d'une zone lisse.

Ces colonies sont repiquées tous les 28 jours jusqu'à la sixième génération. Nous remarquons toutefois que sur les milieux à 10 ‰, nous n'obtenons plus que des colonies chétives et bientôt la souche BCG ne pousse plus.

Nous avons observé l'évolution de nos cultures en les étudiant tous les 5 jours au microscope après avoir traité les frottis par la coloration de ZIEHL NEELSEN dans les conditions suivantes, conditions que nous avons rigoureusement réalisées au cours de toutes nos expériences.

Le frottis est fixé par plusieurs passages à la flamme et traité ensuite de la manière suivante :

Coloration à la fuchsine de ZIEHL fumante, 5 minutes.
Lavage à l'eau distillée froide.
Immersion dans NO^3 H au 1/3, 30 secondes.
Lavage à l'alcool à 60° jusqu'à décoloration.
Passage à l'eau.
Coloration par le bleu de méthylène LŒFFLER, à froid 15 minutes.
Lavage à l'eau et séchage.

Ajoutons que, au cours de nos expériences, nous avons essayé de faire varier les temps de coloration, notamment en ce qui concerne la coloration par le bleu de méthylène ; mais n'ayant pas obtenu de résultats sensiblement différents, nous avons adopté définitivement les temps indiqués ci-dessus que nous avons observés pour toutes nos colorations.

Ainsi traités, nos frottis furent examinés au microscope avec l'objectif à immersion au 1/16ème.

Les bacilles se sont montrés sous la forme de bâtonnets assez longs, en ce qui concerne la souche bovine Vallée, courts en ce qui concerne le BCG, agglomérés en paquets et certains contenant parfois de nombreuses granulations. Ils étaient toujours semblables à ceux des cultures témoins et dans aucune génération, nous n'avons obtenu de diminution d'acido-résistance, ni de formes plus ou moins dégradées, les bacilles observés étant généralement fortement colorés en rouge par la fuchsine.

Toutefois en ce qui concerne l'acide sulfogaïacolique, nous devons noter une coloration moins nette, ce qui pourrait correspondre à une légère perte d'acido-résistance, mais ce fait ne nous a pas semblé assez net pour y attacher une grande importance.

Il ne nous semble donc pas que les milieux acides employés aient une influence quelconque sur l'acido-résistance du bacille de KOCH tout au moins en ce qui concerne les expériences que nous avons effectuées.

CHAPITRE II

Cultures sur milieux contenant un complexe de Tuberculine sérum acide sulfogaïacolique.

Continuant nos expériences, et sur le conseil de notre cher Maître, le Professeur A. SARTORY, nous avons poursuivi les travaux entrepris par lui, en 1927, en compagnie de R. SARTORY et J. MEYER (70) portant sur l'action du complexe tuberculine-sérum-acide sulfogaïacolique sur le bacille de KOCH.

Nous avons donc étudié l'action de ce complexe sur des cultures de bacille tuberculeux in vitro. Pour cela, nous avons utilisé un milieu de culture à l'extrait de pommes de terre préparé de la façon suivante :

On pèle les pommes de terre, on les découpe en fragments minces, on fait cuire une partie des pommes de terre ainsi préparée dans deux parties d'eau ; on laisse macérer pendant 3 ou 4 heures, on filtre sur toile. On ajoute au filtrat à parties égales, un volume de bouillon glycériné glucosé ainsi préparé.

Eau	1.000
Peptone	20
Glucose	20
Glycérine	60
Glycérophosphate de soude	1
Glycérophosphate de Magnésie	0,5
Chlorure de Sodium	5
Extrait Liebig	5

On ajoute 20 grammes pour 1.000 de gélose que l'on fait macérer au préalable et on fait dissoudre par chauffage à l'autoclave.

Ce milieu nous a servi de substrat témoin dans nos expériences.

Pour incorporer notre précipité sulfogaïacolique, dans ce milieu, nous avons préalablement dissous le précipité dans une quantité d'eau distillée en présence de soude, de façon à obtenir une solution à 10 %.

D'autre part, le bouillon glycériné glucosé a été préparé en utilisant des quantités de produits doubles de celles indiquées ci-dessus. On mélange ensuite à parties égales le bouillon et la solution de complexe de façon à obtenir un milieu renfermant les mêmes quantités de substances nutritives que le milieu témoin.

Nous avons ainsi constitué des milieux contenant respectivement :

5 ‰ 10 ‰ et 15 ‰

du complexe tuberculine-sérum antituberculeux-acide sulfogaïacolique.

Ces milieux, de même que le milieu témoin, furent ajustés au pH de 6,8 et 7,2, ensemencés parallèlement au moyen d'une même souche de bovine Vallée et de BCG, puis placés à l'étuve à 37° dans les mêmes conditions expérimentales.

A la vérité, en ce qui concerne le BCG, nous n'avons pu obtenir que des cultures peu florissantes et toujours en retard sur celles de la souche bovine Vallée. Toutefois, pour les premières générations obtenues, les deux souches poussent également bien sur les trois milieux d'épreuve employés, et il ne semble pas que la différence de concentration en complexe, ni même la présence de celui-ci, influent sur le développement de nos colonies.

Au bout de 8 jours, nous avons obtenu, surtout en ce qui concerne la souche bovine Vallée, des colonies florissantes, mamelonnées, de couleur crème, présentant la formation dite en chou-fleur, entourée d'une zone lisse et assez facilement émulsionnable. Cette première génération, observée au microscope après coloration au Ziehl dans les conditions habituelles (voir chapitre I), a gardé les caractères des cultures témoins et peut encore être repiquée positivement après deux mois de séjour à l'étuve à 37°.

Cette génération fut, comme les suivantes, repiquée après 28 jours de culture sur les milieux d'épreuve ainsi que sur le milieu témoin.

La deuxième génération des milieux d'épreuve, puis la troisième, bien qu'elles soient en retard de quelques jours sur celles des milieux témoins, présentent sensiblement les mêmes caractères morphologiques que la première : les bacilles sont toujours acido-résistants, droits ou irréguliers, et souvent fortement granuleux.

Pour mieux apercevoir ces granulations, nous avons coloré les frottis au cristal violet phéniqué de la façon suivante :

Fixage à la chaleur par passage 5 à 7 fois dans la flamme.

Lavage à l'eau distillée.

Coloration par le cristal violet phéniqué 4 ou 5 minutes.

Passage dans la solution de Lugol 4 à 5 minutes.

Décoloration à froid par l'alcool acétone.

Lavage à l'eau.

Coloration au bleu de méthylène 1 minute.

Lavage à l'eau et séchage.

Les granulations apparaissent alors en violet noir et le corps du bacille en rose.

La quatrième génération, toujours étudiée dans les mêmes conditions que les précédentes, donne toujours des colonies abondantes, dans lesquelles la zone lisse augmente, mais les cultures témoins paraissent pousser moins rapidement que les cultures d'épreuve.

Microscopiquement, les cultures âgées de 3 semaines, montrent des formes nettement modifiées et très diverses, bâtonnets plus ou moins longs, irréguliers, droits ou courbes, parfois ramifiés, il y a apparition de formes renflées en massues ; certains éléments, en petit nombre d'ailleurs, ne sont plus acido-résistants et sont colorés en bleu.

La cinquième génération ne nous donne pas d'éléments nouveaux. Notons toutefois, pour les cultures âgées de 3 semaines, l'apparition de nombreux filaments grêles, ténus, non acido-résistants, parfois même ramifiés, souvent on croirait avoir à faire à des formes actinomycosiques. Les granulations ont presque disparu, et les bâtonnets acido-résistants sont, cette fois, nettement en minorité.

Ajoutons que les cultures vieilles de 6 à 8 semaines, nous apparaissent presque totalement dépourvues d'acido-résistance, alors que les cultures témoins au contraire, bien que peu abondantes, ne semblent pas présenter de propriétés morphologiques semblables et gardent leur acido-résistance primitive.

Les cultures d'épreuve de quatrième génération du BCG sont grêles, souffreteuses, mais présentent les mêmes caractères que celles de la cinquième génération de la souche bovine Vallée. Malheureusement, nous n'avons pu obtenir de cultures de BCG de la cinquième génération, la croissance de celui-ci s'étant complètement interrompue sur les milieux d'épreuve comme sur le milieu témoin.

L'influence prolongée du complexe de tuberculine-sérum antituberculeux-acide sulfogaïacolique serait donc un agent susceptible de faire disparaître graduellement et en partie l'acido-résistance du bacille de KOCH.

Toutefois, ces bactéries repiquées sur des milieux semblables au milieu témoin (milieu de pommes de terre glycériné et glucosé) à 37°, récupèrent assez rapidement leurs propriétés habituelles et notamment leur acido-résistance.

Les modifications apportées par le complexe ne nous paraissent donc pas durables.

Nous avons continué nos repiquages de la souche bovine Vallée jusqu'à

la huitième génération, toujours avec le même succès, mais sans observer de nouvelles modifications.

Il nous a semblé toutefois, que les dernières générations se développent plus vite sur les milieux d'épreuve à concentration respective de 10 et de 15‰ du complexe.

Notons également qu'en vieillissant, ces colonies d'épreuve prennent une couleur jaunâtre plus foncée, qu'elles deviennent sèches, friables, et plus difficilement émulsionnables que les colonies des premières générations.

Il est intéressant de noter que les mutations observées par nous dans nos cultures en présence du complexe tuberculine-sérum antituberculeux-acide sulfogaïacolique furent également remarquées par VAUDREMER.

En effet, en cultivant le bacille de KOCH, souche bovine Vallée, sur gélose glucosée à 2 %, et tournesolée, cet auteur obtient au bout de 6 semaines, un bacille ayant perdu toute acido-résistance, se colorant au violet de gentiane, prenant le gram, et poussant sans production d'acide.

D'après lui également, un bacille tuberculeux humain de race C', ensemencé sur Gélose ordinaire, donnerait au bout de 6 semaines des cultures ressemblant à des grains de képhir, et des bacilles sans granulation, non acido-résistants, qui ensemencés en eau peptonée à 2 %, forment une culture abondante, avec des éléments myceliens, et des renflements terminaux rappelant les formes actinomycosiques.

Notons également les travaux intéressants de FERRAN (26) et d'ENDERLEIN (24) sur les mutations du bacille de KOCH, ceux de A.CH. G. HOLLANDE (40) suivant lesquels le bacille tuberculeux au stade très jeune, donne à la surface du milieu solide de SABOURAUD, glycériné glucosé une culture abondante, se développant rapidement, si on la repique tous les 5 ou 6 jours sur le même milieu, et dont les éléments microbiens à peine acido-résistants, parfois même non acido-résistants, sont facilement émulsionnables dans l'eau physiologique.

Citons encore les travaux de SIDENBERG et ECKER (74) qui observent l'apparition spontanée dans leurs cultures d'une forme non acido-résistante de BCG, et enfin les travaux de M.A. SARTORY, en collaboration avec MM. R. SARTORY et J. MEYER « Au sujet de l'action spécifique d'un médicament antituberculeux (le Tasch) » qui nous ont plus directement intéressés.

Voulant détailler l'action du complexe tuberculine-sérum antituberculeux-acide sulfogaïacolique, sur le bacille de KOCH, nous nous sommes attachés à étudier l'action de chacun des composants de ce complexe.

Cette étude fera l'objet du prochain chapitre.

CHAPITRE III

Cultures sur milieu sérum
Cultures sur milieu à la Tuberculine
Cultures sur milieu à acide sulfogaïacolique

Après avoir étudié l'action du complexe sérum antituberculeux-tuberculine-acide sulfogaïacolique sur les cultures de bacilles de KOCH, nous avons étudié séparément l'action de la Tuberculine de KOCH et du sérum de cobaye tuberculeux sur les mêmes souches de bacilles. Nous avons utilisé comme milieu témoin le même que précédemment (voir chapitre II).

Nous faisons remarquer que tous nos milieux de culture étaient à base de glycérine.

La tuberculine de KOCH fut diluée au 1/25^{e}, au 1/50^{e} et au 1/100^{e} de façon à constituer ainsi 3 milieux d'épreuve à des concentrations différentes, sur lesquels nous avons ensemencé nos deux souches. La souche bovine Vallée seule nous a donné des cultures observables.

Chacun des tubes de culture contenait 10 cm^{3} de bouillon témoin et 1 cm^{3} de l'une ou l'autre des dilutions employées.

Les cultures furent faites comme précédemment à l'étuve à 37^{o} aux pH habituels, et dans les mêmes conditions expérimentales.

Au bout de 8 jours, nous obtenons des colonies d'épreuve assez abondantes, mais plus plates que celles des milieux témoins. Elles ne présentent aucun retard sur celles du milieu témoin. Elles furent repiquées jusqu'à la sixième génération.

Observées dans les conditions habituelles, c'est-à-dire après coloration au Ziehl, les cultures sur tuberculine ne nous montrent jamais de diminution d'acido-résistance.

En ce qui concerne les milieux au sérum, nous avons employé du sérum de cobaye tuberculeux inoculé avec la souche bovine Vallée. Comme nous n'avions que peu de sérum, nous avons utilisé des tubes contenant :

10 cm^{3} de bouillon témoin	1 cm^{3} de sérum
10 cm^{3} de bouillon témoin	2 cm^{3} de sérum

Ces milieux d'épreuve furent ensemencés avec la souche bovine Vallée.

Les expériences furent faites comparativement au milieu témoin et au milieu contenant le complexe total : tuberculine-sérum antituberculeux-acide sulfogaïacolique dans les conditions habituelles.

Les cultures sur sérum sont plutôt difficiles à obtenir, nous n'avons que peu de colonies, elles sont très peu abondantes, et présentent le phénomène d'inhibition de la croissance, concordant avec les observations de MARAGLIANO (53).

Il y a bactériolyse des microbes et agglutination. Les colonies furent repiquées jusqu'à la quatrième génération seulement.

A part le phénomène d'inhibition, nous n'avons enregistré aucune modification, tout au moins en ce qui concerne la perte d'acido-résistance.

Ajoutons que parallèlement, J. MEYER avait étudié l'influence du sérum humain, de cheval, de cobaye sain ou tuberculeux, incorporés au milieu témoin à différentes concentrations, sans obtenir de résultats différents.

En ce qui concerne l'acide sulfogaïacolique, les expériences furent reprises par J. MEYER comparativement à l'acide phénique, dans le but de savoir si le groupe phénolique a une action quelconque sur la perte d'acido-résistance du bacille, puisque les acides minéraux ne donnent pas de résultats positifs.

Les cultures sur ces deux acides, seules ne donnent pas de perte d'acido-résistance.

Donc, aucun des composants du complexe tuberculine-sérum antituberculeux-acide sulfogaïacolique ne semble avoir d'influence sur la perte d'acido-résistance du bacille de KOCH, lorsqu'il est employé seul dans les milieux de culture.

Mais des expériences toutes récentes faites par A. SARTORY, R. SARTORY et J. MEYER, il résulte qu'il n'en est pas toujours ainsi si on les emploie en groupe.

En effet, les expériences furent reprises de la façon suivante :

Premier groupe d'expérience

Cultures sur milieux contenant :

SO^4H^2 + tuberculine brute.

Acide sulfogaïacolique + tuberculine brute

Un acide minéral + anti-sérum

Acide organique + sérum normal

Acide organique + anti-sérum.

Dans ces conditions, seules les cultures sur acide organique plus anti-sérum, montrent les mêmes modifications que celles observées sur les milieux au complexe total tuberculine-sérum antituberculeux-acide sulfogaïacolique.

Deuxième groupe d'expérience

Milieux contenant :

Tuberculine de l'Institut Pasteur + anti-sérum.

Tuberculine de Hœchst + anti-sérum.

Tuberculine purifiée + acide phénique ou acide sulfogaïacolique.

Tuberculine brute + acide phénique.

Dans ces dernières expériences, seuls les milieux à base de tuberculine brute de Hœchst + anti-sérum, nous donnent les mêmes modifications que celles observées sur les milieux au complexe total.

Ce qui nous permet de conclure que seule, la présence dans le milieu témoin d'un anti-sérum, de glycérine et d'un groupement phénolique, nous donne une perte d'acido-résistance comparable à celle observée avec les milieux contenant le complexe tuberculine-sérum antituberculeux-acide sulfogaïacolique ; et à ce point de vue, l'acide sulfogaïacolique paraît être plus actif que l'acide phénique.

CHAPITRE IV

Etude expérimentale de la virulence de nos bacilles atténués par comparaison à celle des bacilles des milieux témoins.

A. SARTORY, R. SARTORY et J. MEYER après avoir constaté in-vitro, les modifications morphologiques des bacilles de 4e et de 5e génération des cultures sur le complexe tuberculine-sérum antituberculeux-acide sulfogaïacolique, en ce qui concerne la souche bovine Vallée, ont opéré des inoculations sous cutanées à raison de 0,01 mgr. à 4 cobayes. Ces inoculations ont été faites le 15 novembre 1928. Il s'est formé au niveau de l'inoculation des indurations locales qui ont augmenté dans les premiers quinze jours, puis se sont résorbées peu à peu, et ont disparu définitivement après 5 semaines. Le ganglion inguinal est devenu perceptible, mais l'hypertrophie a disparu également. Les 4 animaux ont vécu plus de 2 ans et le 1er décembre 1929 leur poids était respectivement de 890 grammes, 920 grammes, 1017 grammes, 780 grammes.

4 cobayes ont été également inoculés avec 0,01 mgr. de bacilles de 3e génération. Ils sont morts d'une tuberculose atypique analogue à celle rencontrée chez les cobayes inoculés par de l'ultravirus tuberculeux.

Nous avons également vérifié la perte de virulence de nos bacilles de la 4e et de la 5e génération par comparaison à celle des cultures de milieu témoin.

Pour cela, nous avons opéré de la façon suivante :

Nous avons utilisé des cultures de 4e génération de la souche bovine Vallée sur le milieu témoin, et des cultures de même âge et de la même souche faites en présence du complexe tuberculine-sérum antituberculeux-acide sulfogaïacolique. Les inoculations furent faites à des cobayes ayant sensiblement le même poids.

Pour cela, nous avons prélevé à l'aide d'un ensemenceur stérilisé, une petite quantité de culture que nous avons portée sur un petit carré de papier glacé stérile (préalablement taré), dans un verre de montre, sur la balance de précision. Nous avons ainsi pesé un mgr. de bacilles. Ces bacilles furent déposés dans un mortier de verre stérile et émulsionnés soigneusement avec du sérum physiologique. Nous avons ainsi obtenu les solutions suivantes:

Solution contenant un mgr. de bacille cultivé sur milieu témoin pour 10 cm^3 de sérum physiologique.

Solution contenant 1 mgr. de bacille du milieu témoin pour 5 cm^3 de sérum physiologique.

Solution contenant 1 mgr. de bacille cultivé sur milieu contenant le complexe tuberculine-sérum antituberculeux-acide sulfogaïacolique pour 10 cm^3 de sérum physiologique.

Solution contenant 1 mgr. de bacille du milieu au complexe pour 5 cm^3 de sérum physiologique.

Ces solutions furent introduites sous la peau de la cuisse de 4 cobayes ayant sensiblement le même poids le 21 janvier 1935.

Pour le cobaye inoculé à la dose de 0,2 mgr. de bacille du milieu témoin, nous avons remarqué après quatre jours une légère inflammation locale avec œdème. Le ganglion de l'aine augmente de volume, devient dur. D'abord gros comme un grain de chénevis, il s'accroît jusqu'à la dimension d'une noisette. L'animal commence à maigrir, le poil perd son brillant, les côtes deviennent apparentes, la respiration s'accélère. Au bout de 4 semaines, l'animal meurt, après avoir diminué de poids dans les conditions suivantes :

390 gr. le 22 janvier 1935.
365 gr. le 28 janvier 1935.
355 gr. le 3 février 1935.
325 gr. le 8 février 1935.

A l'autopsie, il présente des caractères très nets de la tuberculose généralisée :

Nombreuses lésions dans tous les organes, le ganglion initial est énorme, entouré de tissu œdemateux et rempli de pus crémeux, épais et inodore. La cavité abdominale renferme une grande quantité de liquide. Le foie est hypertrophié. La rate est 6 ou 8 fois plus grosse qu'à l'état normal et couverte de grains jaunâtres. Les reins sont décolorés, les capsules surrénales sont très grosses. Après ouverture de la cavité thoracique, on voit que les poumons sont atrophiés, ils présentent de nombreux tubercules et de nombreuses lésions.

Examiné au microscope après coloration par le Ziehl, le pus des ganglions montre de nombreux bacilles tuberculeux, libres ou en paquets ou englobés, dans des cellules lymphatiques, et fortement acido-résistants.

Le deuxième cobaye inoculé dans la même façon que le premier, mais à l'aide de 0,1 mgr. de bacille du milieu témoin, meurt au bout de 8 se-

maines, présentant encore les symptômes de la tuberculose généralisée, pourtant moins accentuée que celle du premier cobaye.

Nous constatons encore une perte de poids très sensible :

525 gr. le 22 janvier 1935.
525 gr. le 28 janvier 1935.
515 gr. le 3 février 1935.
500 gr. le 8 février 1935.
463 gr. le 15 février 1935.
455 gr. le 21 février 1935.
440 gr. le 27 février 1935.

En ce qui concerne les 2 cobayes inoculés à l'aide de bacilles cultivés sur le milieu au complexe tuberculine-sérum antituberculeux-acide sulfo-gaïacolique, nous avons obtenu des résultats sensiblement différents.

En effet, le premier cobaye inoculé à l'aide de la solution contenant 0,2 mgr. de bacilles, présente au bout de 8 jours, des indurations locales au niveau de l'inoculation qui augmentent pendant quelques semaines, semblent diminuer un peu, puis réapparaissent. Toutefois, l'animal meurt le 15 avril 1935, après avoir survécu 4 mois et sans avoir subi de perte de poids durant les dernières semaines.

En effet, nous enregistrons les poids suivants :

390 gr. le 22 janvier 1935.
330 gr. le 28 janvier 1935.
365 gr. le 3 février 1935.
385 gr. le 8 février 1935.
385 gr. le 15 février 1935.
385 gr. le 21 février 1935.

à partir de ce moment, jusqu'à sa mort, l'animal se maintient à 385 gr.

L'autopsie, faite immédiatement après la mort de l'animal, nous montre que nous sommes en présence d'un cas de tuberculose atypique et se rapprochant plutôt de la tuberculose du lapin :

La mort paraît due à l'asphyxie.

Le foie est hypertrophié.

La rate est restée saine.

Par contre les poumons sont très malades et présentent de nombreuses lésions tuberculeuses.

La vessie et les intestins sont normaux.

Le cœur est hypertrophié.

Il y a deux gros nodules tuberculeux au niveau de l'inoculation.

Le pus des ganglions est très épais. Après examen au microscope, et coloration Ziehl, nous notons la présence de bacilles isolés très longs et acido-résistants.

Nous insistons sur le fait que l'animal n'avait pas diminué de poids, et semblait bien portant. Notons en outre que la mort survient à l'époque du changement de nourriture, et des fonctions de reproduction, époque à laquelle l'animal est en état de moindre résistance.

Notre dernier cobaye inoculé à la dose de 0,1 mgr. de bacilles du milieu au complexe est encore en vie à l'heure actuelle. Il semble tout à fait bien portant, et n'a même pas de ganglions.

Il semblerait donc que les changements morphologiques et la perte d'acido-résistance apportés au bacille tuberculeux par les cultures sur complexe tuberculine-sérum antituberculeux-acide sulfogaïacolique, affaiblissent quelque peu la virulence de ce dernier.

CONCLUSIONS

Nos expériences, résumées dans les chapitres précédents, nous conduisent aux conclusions suivantes :

1° La culture du bacille de KOCH sur des milieux contenant des acides minéraux et organiques tels que Acide chlorhydrique, acide sulfurique, acide phénique, acide sulfogaïacolique employés seuls, et au titre de 5 ‰ et de 10 ‰, ne diminue pas l'acido-résistance du bacille, de même qu'elle n'a aucune action sur sa morphologie.

2° L'action prolongée du complexe tuberculine-sérum antituberculeux-acide sulfogaïacolique, réalise un effet modificateur très intéressant sur la constitution du bacille et diminue presque totalement son acido-résistance.

3° En outre, notons l'apparition, sous l'influence du complexe, de formes de mutation analogues aux formes rencontrées chez les actinomycetées. Le bacille tuberculeux pourrait donc s'apparenter à ceux-ci.

4° Nous obtenons une perte de virulence très nette des cultures de 4e génération obtenues sur le complexe, ce qui pourrait conduire à la préparation d'un antigène à partir des bacilles de ces cultures.

5° Les composants du complexe employés séparément dans les milieux de culture n'ont aucune action sur l'acido-résistance du bacille.

6° Par contre, la présence d'un groupement phénolique + anti-sérum et glycérine donne une perte d'acido-résistance très nette et tout à fait analogue à celle obtenue sur les milieux à base du complexe.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Arloing et Courmont : Compte rendu de la Société de Biologie 16 et 31 mai 1918.

(2) Auclair : Archives de Médecine expérimentale et d'Anatomie pathologique 4 juillet 1903.

(3) Auclair et Paris : Archives médicales expérimentales 1908-XX, page 737. Bulletin social d'études scientifiques de la Tuberculose, 1911-1922.

(4) Baerthlein K : Ztbl. f. Bakt. Abt. I Orig. 1918, p. 369.

(5) Baerthlein et Toyoda A : Centralb. f. Bakt. I Abt. Ref. 57, 1913, p. 281.

(6) Baillie : Traité d'anatomie pathologique, Paris 1803.

(7) Bang O. : Centralbl. f. Bakt. I Orig. 46, 1908, p. 461.

(8) G. L. Bayle : Recherches sur la Phtisie pulmonaire, Paris 1810.

(9) Begbie : Edinburg Med. J. 1931, p. 174.

(10) Bezançon et Philibert : Société d'Etudes scientifiques sur la Tuberculose, 12 mars 1914, p. 32.
Presse Médicale, 9 janvier 1926, p. 33.

(11) Bienstock : Forts, d. Med. 1886 4, p. 193.

(12) Birkhaug : Am. Rev. Tuberc. 1933.
Compte rendu de la Société de Biologie 1933, p. 726, 1934, p. 424.
Etudes sur la dissociation du Mycobacterium Tuberculosis, Annales de l'Institut Pasteur, Février 1935.

(13) Bulloch et Mac Leod : Journ. of Hyg. 191 IV Bull. I not. Past. 1904.

(14) Christison : Ctbl. f. Bakt. orig. 1932, p. 73.

(15) Mary Cowan : Brit. J. Exp. Path ; 3 1922, p. 187 ; 4 1923, p. 241 ; 5 1924, p. 226 ; 8 1927, p. 6.

(16) A. Delille et Gavois : C. R. de la Société de Biologie 1933, p. 1150.

(17) S. C. Dixon : Journ. of. Amer. M. A. 29 mars 1913.

(18) Doan : Med. Clinics of. North America 193, p. 279.

(19) Dorset et Emery : Annal Report Bureau of Animal Industry 1904 Centralbl. f. Bakt. 1906. XXX VII, p. 363.

(20) Mlle T. Dubosc et M. Roux : Bulletin de l'Académie des Sciences, Séance du 24 juillet 1922.

(21) Ehrlich : Deutsche Medic. Wochensch. 1882, N° 19.
Beitrag zur Theorie der Bacillen Färbung.
Charité-Annalen 1886 II, p. 123.

(22) Elbert B. et Gelberg S. : Annales de l'Institut Pasteur, 1930, p. 48.

(23) Elliot Smith, Ruffer, Fouquet : Bulletin of the Archeological Survey of Nubia 1907.
Bulletin de la Société Archéologique d'Alexandrie 1907-1912.

(24) Enderlein : Die biologischen Unterlagen der Tuberkulose. Infenktions Archiv. f. Entr. Gesch. d. Bakt. Bd. I 1931, p. 53.

(25) J. Erskov : Recherches sur l'acido-résistance du bacille de la Tuberculose ; Société Danoise de Biologie 1926.

(26) Ferran : Comptes rendus de l'Académie des Sciences, 11 octobre 1897.
Congrès international de la Tuberculose Paris 1905, p. 170.
Les mutations bacillaires Barcelone Institut Ferran, 1923.
(27) Fischer : Faerbung, Fixierung und Bau des Protoplasmas 1899, p. 114.
(28) Fontes : Centralbl. f. Bakt. 1909, X. L. IX, p. 317.
(29) Frei : L'Infection bacillaire et la Tuberculose par Calmette 1928.
(30) Gasis : Centralbl. f. Bakt. 1902. XXX. II, p. 161-320, 1909, p. 111.
(31) Gasperini A. : Soc. toscana di Scienze nat. 5, 1895, p. 1.
(32) M. Gessard Fernbach, Rullier : Bulletin de l'Académie des Sciences, séance du 30 novembre 1925.
(33) Gildemeister E. : Centralbl. f. Bakt. Orig. 86, 1921, p. 513.
(34) Goris : Annales de l'Institut Pasteur, 1920, p. 34-537.
(35) Griffith F. : Rep. Publ. Health Med. Subj. London N° 18, 1923. J. Hyg. 27, 1928, p. 113.
(36) Grimme : Centralbl. f. Bakt. 1902 XXX II, p. 161 et 320.
(37) Hammerschlag : Centralbl. f. Klin. Med. 1891.
(38) Hammerschlag et Helbing : Deutsch. med. Woche 1900, p. 133.
(39) Hardley P. : J. Inf. Dis. 40, 1927, p. 1.
(40) A. Ch. et G. Hollande : Etudes cytologiques de quelques microbes pathogènes de l'homme, leur cycle évolutif.
Arch. de Zool. exp. et Gén. T. 72, Fasc. 6 1932. p. 445.
(41) M. Isabolinsky et W. Ghitovitch : Institut Bactériologique de Smolensk, de la Bactériolyse du Bacille de Koch.
Annales de l'Institut Pasteur, 1926.
(42) Julianelle L. : J. Exp. Med. 44, 1926, p. 683 ; 47, 1928, p. 889.
(43) Kahn M. : Amr. Inst. Pasteur 1930, American Review of tuberculoses vol. XX Août 1929, p. 130.
(44) Koch : Berlin Klin. Wochens. 1882, N° 15, Mitth. aus d. Kaiserl. Gesundheit 1884, II Berlin.
(45) Kolle W. Schlossberger H. : et Pfannenstiehl W. : Deutsche med. Wchnschr. 47, 1921, p. 437.
(46) Konstantin Kleptzov : Bull. off, Intern. d'Hyg. Pub. Mars 1913.
(47) Kraus R. Ztschr. f. Immunitaetsforsch. 1929, p. 454.
(48) Lehmann et Neumann : Atlas und Grundriss der Bakteriologie Berlin 1896.
(49) Lobstein E. : Recherches Biochimiques sur le Bacille tuberculeux. Thèses Doc. Sc. Strasbourg 1922.
(50) Long : Amer. Rev. of. Tubercul. 1922, p. 642.
(51) A. Machado : Société de Biologie séances du 10 novembre et du 14 décembre 1926.
(52) Stephen Maer : Medical Record. New-York Novembre 1910, p. 845.
(53) Maragliano : Berlin Klin. Woch. 1899, 76, p. 1073, Soc. Biol. 1897, 49-309.
(54) Massini R. : Archiv. f. Hyg. 61, 1907, p. 250.
(55) Mazur : Kazab med. Z. 1932, p. 829.
(56) Nechtadimenko, Odrina, Syssac et Anguernitski : Annales de l'Institut Pasteur 1930, p. 54.
(57) Negre, Valtis, Bonnefoi : C. R. de la Société de Biologie 1933, p. 1060. Annales de l'Institut Pasteur 1933, p. 591.

(58) Neisser M. : Ztbl. f. Bakt. I Abt. Ref. 38, 1906.
(59) Nocard I. : Annales de l'Institut Pasteur 12, 1898, p. 561.
(60) A. M. Oyuela : Revista Mecial del Urnguay I 1919.
(61) Pappenheim : Grundriss der Farbenchemie 1901.
(62) Petroff S. A. Branch A. Steenken W. et Winn : Am. Rev. Tuberc. 1929, p. 9.
J. Exp. Med. 1930, p. 831 ; J. Exp. Med. 1933, p. 239.
(63) Reed et Rice : Cand. J. Research 1931, p. 389.
J. Immunol 1932, p. 385.
(64) Th. Reid : Essay an the nature and cure of phtisis pulmonalis Londres 1785.
(65) Reimann H. : J. exp. Med. 41 1925, p. 587 ; 43 1926, p. 107 ; 45 1927, p. 807.
(66) R. Royo Villanova et J. Pardo Canalis : Bulletin de l'Académie de Médecine séance du 19 février 1935.
(67) Ruppel : Zeitschrift f. physiolog. Chemi. 1898, XX VI, p. 218.
Centralbl. f. Bakt. 1896 XX, p. 499.
(68) Saenz et Costil : C. R. de Société de Biologie 1933, p. 1503, 1934, p. 308.
(69) J. Santini : Revue Internationale de la Tuberculose XX, V. 5 mai 1914, p. 276.
(70) A. et R. Sartory et J. Meyer : Au sujet de l'action spécifique d'un médicament antituberculeux (Le Tasch) 1934.
Bull. Académie Méd. Février 1928 et Bull. Sc. Pharmacol. T. XX, X, V, 1928, p. 161.
(71) Schnieder : Centralbl. f. Tuberk. 1933, p. 405.
(72) Schwarzkopf et Kahn : Proc. Soc. Exp. Biol. et Med. 1930, p. 380. Am. Revue Tuberc. 1931, p. 45.
(73) Seibert, Long et Morley : J. Inf. dis. 1933, p. 175.
(74) Sidenberg et Ecker : The Shont anons occurence of a nonacid. fast forme in a culture of B.C.G. Amer. Rev. of Tub. the 29 mai 1934, p. 51.
(75) Soule M. : J. Inf. Dis. 42 1928, p. 93 ; 46 1932, p. 30.
(76) Spina : Allgem. Wien. md. Zeitschr. 1887.
(77) Suneyaga : American Revue of Tuberculose 1919, p. 473 ; 1920 p. 526 ; 1925 p. 260.
(78) Tamura : Zeitschrift fuer Physical Chemist 1913, p. 87.
(79) Topley W. et Ayrton J. : J. Hyg. 22, 1924, p. 234 et 305.
(80) Tzeknowitzer : Annales de l'Institut Pasteur 1930, p. 162.
(81) Valtis et Van Deinse : Annales de l'Institut Pasteur 1933, p. 419. 1934, p. 51.
C. R. de la Société de Biologie, 1933, p. 669.
(82) Vaudremer : Société de Biologie, 10 décembre 1921 et 5 février 1921.
(83) Villanova et J. Pardo Canalas : contribution à l'étude du rôle que le silicium semble jouer dans l'immunité contre la tuberculose pulmonaire. Bulletin de l'académie de Médecine, février 1935, Tome 113, N° 7.
(84) Villemin : Etudes sur la tuberculose, Paris 1868.
(85) R. Vollum : Zeitschr f. Immunitats f. T. 27, 15 décembre 1932, p. 327.
(86) Bruce White P. J. Path and. Bact. 30, 1927, p. 113, 31, 1928, p. 423.
(87) Fernand Wyss : Bulletin de l'Académie des Sciences, Séance du 8 octobre 1923.
(88) Zulmann : Centralblat. f. Immunitaets. forsh. 1933, p. 1.

Vu
Strasbourg, le 12 juin 1935.
Le Président du Jury,
A. SARTORY

Vu et approuvé :
Strasbourg, le 13 juin 1935.
Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,
J. E. LOBSTEIN.

Vu et permis d'imprimer :
Strasbourg, le 15 juin 1935.
Le Recteur de l'Académie,
Président du Conseil de l'Université,
J. DRESCH.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 9

HISTORIQUE 13

DEUXIÈME PARTIE. — Recherches personnelles 19

I. — Cultures sur milieux acides 19

II. — Cultures sur milieux contenant un complexe de Tuberculine sérum acide sulfogaïacolique 23

III. — Cultures sur milieu sérum. — Cultures sur milieu à la Tuberculine. — Cultures sur milieu à acide sulfogaïacolique 27

IV. — Etude expérimentale de la virulence de nos bacilles atténués par comparaison à celle des bacilles des milieux témoins 31

CONCLUSIONS 35

BIBLIOGRAPHIE 37

Imprimerie FREISZ
Saint-Dié